



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Evaluación de una prueba de inmunocromatografía para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Dirofilaria immitis* en condiciones de campo en gatos

Evaluation of an immunochromatography test to detect the presence of anti-*Dirofilaria immitis* antibodies under field conditions in cats

Autor/es

Joan Zaragoz  Ortega

Director/es

Sergio Villanueva Saz

Antonio Fernández Casasnovas

Facultad / Escuela

Facultad de Veterinaria Universidad de Zaragoza

Año

2020/2021

ÍNDICE

Resumen

Introducción

- Características
- Distribución en Europa
- Inmunología
- Cuadro clínico
- Diagnóstico
- Tratamiento

Justificación y objetivos

Materiales y métodos

Resultados

Discusión

- Influencia de factores en datos de prevalencia
- Método diagnóstico

Conclusiones

Valoración personal

Bibliografía

RESUMEN

Castellano:

Evaluación de una prueba de inmunocromatografía para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Dirofilaria immitis* en condiciones de campo en gatos.

La dirofilariosis felina es una enfermedad de transmisión vectorial producida por el nemátodo *Dirofilaria immitis*. La enfermedad en el perro es endémica en los países mediterráneos, sin embargo, la información disponible de esta enfermedad en el gato y sus características epidemiológicas es escasa, debido principalmente a la falta de pruebas de confirmación diagnóstica para la especie felina, puesto que las pruebas para perros son poco sensibles cuando se usan en el gato. En este sentido, es interesante el desarrollo de pruebas específicas que permitan la detección de la infección.

Por otra parte, se lleva a cabo una revisión de los distintos métodos diagnósticos orientados a la detección de *D. immitis*, así como a la monitorización de la enfermedad. A pesar de disponer de gran variedad de métodos diagnósticos, la mayor parte de ellos son ineficaces en el gato, pues la respuesta inmune de los felinos no permite el desarrollo de gran número de gusanos adultos. Esta característica junto a la ausencia de microfilaremia hacen que la prueba más fiable sea la detección de anticuerpos.

De las 250 muestras de suero analizadas, el test SoloStep®FH detectó anticuerpos en nueve animales, mientras que la prueba ELISA detectó en 61 sueros (ocho muestras con niveles altos, 35 muestras con niveles de anticuerpos medios y finalmente 18 muestras con niveles bajos de anticuerpos). En relación al test rápido en desarrollo evaluado, detectó un total de 40 muestras (40/61). Todas las muestras seropositivas en el test rápido en desarrollo fueron también positivas para la prueba de ELISA, detectando todas las muestras con niveles altos (8) y la mayoría de las muestras con niveles medios de anticuerpos (32). Dos muestras seropositivas para el test rápido SoloStep®FH, fueron negativas para el test ELISA y el test rápido en evaluación.

English:

Evaluation of an immunochromatography test to detect the presence of anti-*Dirofilaria immitis* antibodies under field conditions in cats.

Feline dirofilariosis is a vector-borne disease caused by the nematode *Dirofilaria immitis*. The disease in dogs is endemic in the Mediterranean countries. However, the available information of this disease in cats and its epidemiological characteristics is scarce, mainly due to the lack of diagnostic confirmation tests for the feline species, since tests for dogs are less sensitive when used in cats. In this sense, it is interesting to develop specific tests that allow for the detection of the infection.

On the other hand, a review is carried out of the different diagnostic methods aimed at the detection of *D. immitis*, as well as the monitoring of the disease. Despite having a wide variety of diagnostic methods, most of them are ineffective in cats because the immune response of felines does not enable the development of large numbers of adult worms. This characteristic together with the absence of microfilaremia make the antibody test the most reliable method.

Of the 250 serum samples analyzed, the SoloStep®FH test detected antibodies in nine animals, while the ELISA test detected antibodies in 61 serums (eight samples with high levels, 35 samples with medium antibody levels and finally 18 samples with low antibody levels). Regarding the test under evaluation, it detected a total of 40 samples (40/61). All seropositive samples in the developing test were also positive for the ELISA test, detecting all samples with high levels (8) and most of the samples with medium levels of antibodies (32). Two seropositive samples for the SoloStep®FH test were negative for the ELISA test and the test under evaluation.

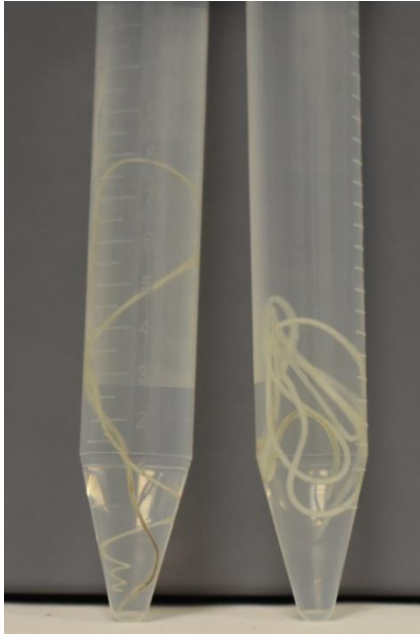
INTRODUCCIÓN:

- **CARACTERÍSTICAS:**

La dirofilariosis es una enfermedad parasitaria causada por *Dirofilaria immitis* que afecta principalmente a cánidos y felinos, aunque también a otras especies de mustélidos y carnívoros salvajes (Villanueva et al., 2021). Se trata de un parásito cuya transmisión es dependiente de la picadura de los mosquitos del género *Culex*, *Aedes* y *Anopheles* principalmente (Montoya-Alonso et al., 2017). No obstante, se estima que existen más de 70 especies de mosquito capaces de transmitir *D. immitis* (Bendas et al., 2019). Estos vectores artrópodos son especialmente sensibles a los factores climáticos, por tanto, la epidemiología del parásito está íntimamente ligada al clima de la zona geográfica y a la ecología del vector (fertilidad, densidad, etc.). En relación con el hospedador susceptible, otros factores como las condiciones de vida (gatos indoor o gatos de vida libre), las condiciones de bienestar animal (densidades de población, tratamientos profilácticos) y la edad son determinantes para el desarrollo y transmisión del parásito (Anvari et al., 2020).

El agente etiológico de la dirofilariosis es un nematodo clasificado taxonómicamente dentro de la Superfamilia *Filaroidea*, Familia *Filariidae*, Género *Dirofilaria*, Especie *Dirofilaria immitis*. Se trata de un nematodo largo y blanquecino cuyas formas adultas (hembra 15-30cm, macho 12-20cm) residen en arterias y ventrículo derecho del corazón del hospedador. Las hembras son ovovivíparas y liberan huevos que contienen larvas. Estos huevos eclosionan y las microfilarias quedan libres en sangre (Carretón et al., 2017). El mosquito hematófago al ingerir sangre de un animal infectado se infecta con las microfilarias que se desarrollan hasta alcanzar el estadio L3 en los túbulos de Malpighi (Rodrigo Morchón et al., 2012), una estructura anexa al intestino de los insectos cuya función es la excreción y osmorregulación (Piermarini et al., 2017). El mosquito con la picadura inocula la larva L3 a la circulación sanguínea donde pasará por las distintas fases larvarias hasta llegar a la forma adulta (**Figura 1**), un proceso que dura entre cuatro y nueve meses. Los adultos pueden llegar a sobrevivir hasta 5-7 años y las microfilarias hasta dos años en circulación sanguínea. Sin embargo, la evolución del ciclo en gatos es más lenta que en perros y es frecuente la ausencia de microfilaremia (Morchón et al., 2012). Además, debido a la intensidad de la respuesta inmune de los gatos, es extraño observar un número elevado de filarias en estadio adulto, mientras que en un perro infestado se puede encontrar hasta 250 filarias adultas (Carretón et al., 2017). Esta variabilidad entre especies se cree que se puede deber a la magnitud de la respuesta inmune del hospedador contra el parásito y la bacteria simbiote *Wolbachia*. En una infección experimental en gatos, solo una

pequeña parte de las larvas infectivas inoculadas llegan al estadio adulto y en las infecciones naturales, las filarias adultas suelen aparecer dañadas, fragmentadas o muertas (R. Morchón et al., 2004). Por tanto, los gatos, aunque son hospedadores, no se consideran reservorio del parásito y presentan una menor capacidad de transmisión del mismo.



Aun así, el parásito puede causar lesiones en el gato sin necesidad de alcanzar la forma adulta. La sintomatología más frecuente en la dirofilariosis felina incluye signos generales como pérdida de peso, fatiga y anorexia, además de signos digestivos y respiratorios como pueden ser dificultad respiratoria, taquipnea, tos. También se puede acompañar de signos digestivos como cuadros eméticos y diarreas. En casos excepcionales, la llegada de larvas o filarias adultas al sistema respiratorio puede inducir a la aparición de la enfermedad respiratoria asociada al gusano del corazón, con la presentación de síntomas de mayor gravedad como taquicardia, ceguera, colapso, convulsiones y muerte súbita. (Villanueva-saz et

al., 2021)

Figura 1. Parásitos adultos de *D. immitis*. El gusano de la izquierda es un macho (terminación de la cola en espiral) y el gusano de la derecha es una hembra.

- **DISTRIBUCIÓN EN EUROPA**

En los países mediterráneos la dirofilariosis es endémica (Morchón et al., 2012), sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado la expansión del parásito hacia Europa central y del este, zonas que se consideraban libres de la enfermedad.

Europa es uno de los continentes donde más profundamente se ha estudiado la prevalencia de la dirofilariosis animal. Realizando una división entre la distribución estudiada hasta el año 2001 y la obtenida a partir de este año, se observa un cambio significativo en la epidemiología de este parásito. La tendencia que sigue durante los últimos años y en la actualidad es a expandirse hacia el norte y el este de Europa, aumentando el número de países europeos endémicos, calificación asignada históricamente solo a países mediterráneos como Portugal, España, Francia, Grecia e Italia. Anteriormente al año 2001, los casos publicados fuera de estos países eran casos aislados (Morchón et al., 2012).

Hasta la actualidad, son escasos los estudios dedicados al análisis de prevalencias de *D. immitis* en gatos en Europa. Sin embargo, a continuación, se recopilan una serie de datos de prevalencia en países mediterráneos (zona endémica) con el fin de contextualizar los datos de distribución en España que se analizarán en la discusión conjuntamente a los datos obtenidos en este estudio.

En un estudio de prevalencia en gatos realizado en Portugal (Vieira et al., 2015), se analizaron 434 muestras mediante un test de detección de anticuerpos anti-*D. immitis* y anti-*Wolbachia*. El resultado fue de un 15% positivos, detectando las prevalencias más elevadas en las regiones de Aveiro (costa centro-norte) y Viseu (interior centro-norte), 18,7% y 17,6% respectivamente.

En el caso de Italia, según un cuestionario epidemiológico realizado por (M. Genchi et al., 2019) dirigido a veterinarios de distintos ámbitos (clínicas, cirujanos, hospitales y sector público) y en distintas zonas geográficas, obtuvieron que un 4,8% de los clínicos afirmaron haber diagnosticado dirofilariosis en gatos durante el periodo de estudio.

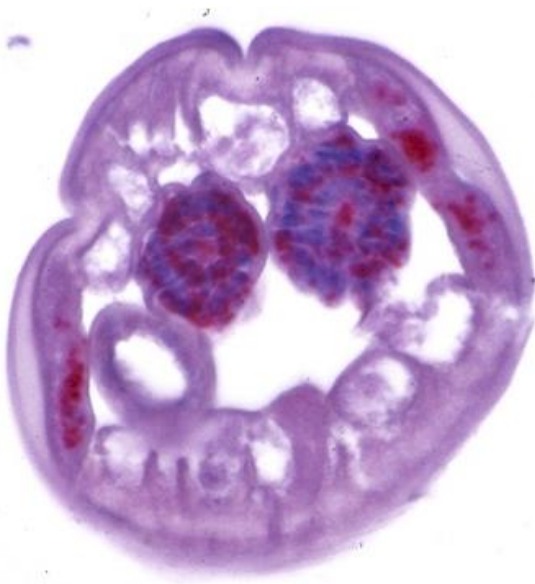
En Grecia, (Diakou et al., 2019), analizaron la proporción de gatos positivos a *D.immitis* respecto a perros en un refugio del norte de Grecia (área endémica). Se analizaron 180 animales (148 perros y 32 gatos) mediante el test de Knott y por serología para la detección de antígenos y, además, detección de anticuerpos en gatos. Los resultados mostraron un 25% de prevalencia en perros frente a un 9,4% en gatos.

- **INMUNOLOGÍA**

Muchas especies de nematodos, incluida *D. immitis*, albergan un género de bacterias gram negativas, intracelulares y endosimbiontes conocidas como *Wolbachia*. Es la bacteria más distribuida en la biosfera y sus hospedadores principales son los artrópodos y nematodos. La presencia de *Wolbachia* en las infecciones por *D. immitis* en gatos juega un papel de interés en el diagnóstico, pues desata la respuesta inmune y la producción de anticuerpos. Esta respuesta se puede utilizar para complementar el diagnóstico serológico.

En un estudio realizado por el equipo de (R. Morchón et al., 2004) evaluaron la respuesta inmune específica (IgG) de gatos en condiciones de laboratorio y de campo frente a péptidos sintéticos de *D.immitis* (Dipp) y frente a la proteína de superficie de *Wolbachia* (WSPr).

Los resultados obtenidos confirmaron una intensa respuesta inmunitaria de los gatos contra la filaria y la influencia de la bacteria endosimbionte para el desarrollo de IgG. Es decir, la respuesta humoral de los gatos infectados no solo va dirigida contra la filaria sino también contra *Wolbachia* (**Figura 2**), que puede ser excretada masivamente tras la muerte de las larvas y/o filarias adultas. Estos datos pueden sugerir que *Wolbachia* juega también un papel importante en las reacciones inflamatorias en gatos con dirofilariosis. Por tanto, con el

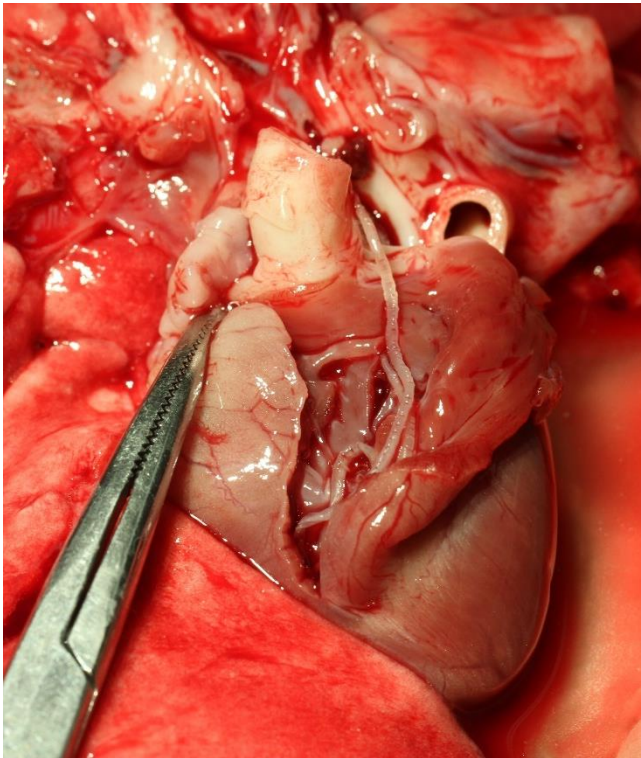


objetivo de afinar el diagnóstico se pueden usar métodos serológicos de detección de anticuerpos anti-*Dirofilaria immitis* pero también anticuerpos anti-*Wolbachia*. Además, se estima que la aparición de IgG anti-Dipp y anti-WSPr ocurre a los 2 meses post-infección y se detecta un aumento de ambos, aunque más ralentizado en el caso de los anticuerpos frente a *D. immitis*, hasta los seis meses (final del estudio) donde los valores de anticuerpos son los más elevados.

Figura 2. Distribución de *Wolbachia* en *Brugiamalayi*. Corte transversal de una hembra adulta, *Wolbachia* se detecta porque se han marcado específicamente las proteínas de la superficie de *Wolbachia* con un anticuerpo (en rojo). La distribución de *Wolbachia* en *D. immitis* es muy similar. Cortesía del Dr.Slatko.

- **CUADRO CLÍNICO**

Aunque muchos gatos no manifiestan signos clínicos tras la infección, existen una serie de ellos que aparecen principalmente coincidiendo con la llegada de las filarias a los vasos pulmonares o con la muerte de las filarias adultas. La primera fase tiene lugar aproximadamente a los tres o cuatro meses post-infección y se suele confundir con procesos asmáticos o de bronquitis alérgica. En esta fase encontramos lesiones histopatológicas como la hipertrofia de las arteriolas pulmonares y áreas de infiltración de eosinófilos, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en los alveolos (Litster & Atwell, 2008). Se cree que en este momento las filarias



inhiben la respuesta inmunitaria del hospedador, haciendo que el gato tolere la infección sin sintomatología aparente hasta que las filarias maduras empiezan a morir. En esta segunda fase se puede observar neumonía y tromboembolismo. Este tipo de reacciones se pueden dar incluso en infecciones por una sola filaria (**Figura 3**).

Este tipo de infecciones pueden provocar regurgitación en la válvula tricúspide del corazón con la auscultación de soplos cardíacos.

Figura 3. Corazón de gato con una sola microfilaria. Cortesía de la American Heartworm Society

Sin embargo, la mayoría de gatos toleran la infección sin signos clínicos o con signos leves transitorios. En el caso de que se produzcan, suelen afectar principalmente a sistemas respiratorio, digestivo y, en ocasiones, neurológico. Entre otros, los más comunes son: hiperventilación persistente, tos intermitente y dificultad respiratoria. Por otra parte, es frecuente la aparición de vómitos no relacionados con la ingesta. Menos comunes son signos clínicos como anorexia, pérdida de peso o aparición sobreaguda de ataxia, colapso, hemoptisis y muerte. (American Heartworm Society, 2020)

- **DIAGNÓSTICO:**

La diferente forma de infección entre gatos y perros supone una necesidad de adaptación de los métodos diagnósticos. En perros, el diagnóstico se basa en la detección de antígenos, un método útil en casos de infección con presencia de un número suficiente de hembras adultas. En este sentido, el diagnóstico en gatos resulta más complejo que en perros por la baja carga de filarias en las infestaciones y por la ausencia de microfilaremia.

En el diagnóstico serológico, encontramos distintas pruebas de detección de antígenos orientados al diagnóstico en perros, aunque también se usan en gatos. Existen distintas casas comerciales que han desarrollado este tipo de test, aunque la metodología es muy similar. Entre ellas encontramos: Snap 4Dx® (Idexx), SpeedDiro® (Virbac), Anigen HW Ag 2.0® (Bionote), CHW Ag® (QuickingBiotech), UranotestDirofilaria® (Uranovet), Witness® (Synbiotics - Pfizer), FasTest HW Antigen® (Megacor), DFV test dirofilaria® (Divasa), SensPERT CHW® (SensPert). Además de los tests de antígenos de pocillos, Petchek Filaria PF® (Idexx), Filarchek® (Ingenasa), Dirochek® (Pfizer).

Se dispone de datos de sensibilidad y especificidad de los tests de Urano y de Virbac. La prueba de Urano test indica un 94,4% de sensibilidad en comparación con la necropsia. Su especificidad es del 100%, también frente a necropsia (Urano). En cuanto al test de Virbac, los datos están expresados en comparación con la técnica de referencia, el test de Knott modificado y ELISA. Los resultados obtenidos son de 95,2% en sensibilidad y 99% en especificidad (Virbac).

Este tipo de pruebas pueden dar falsos negativos en infecciones con cargas parasitarias ligeras, infecciones con solo filarias macho o infecciones con filarias jóvenes (menores de seis meses). Según la American Heartworm Society también se han observado falsos negativos por la formación de complejos antígeno-anticuerpo que interfieren en la detección.

Otro método diagnóstico muy utilizado en esta enfermedad es el test de Knott. Se trata de una técnica de concentración e identificación de microfilarias, principalmente de *D. immitis*. A su vez, este test se combina con un frotis sanguíneo (**Figura 4**).

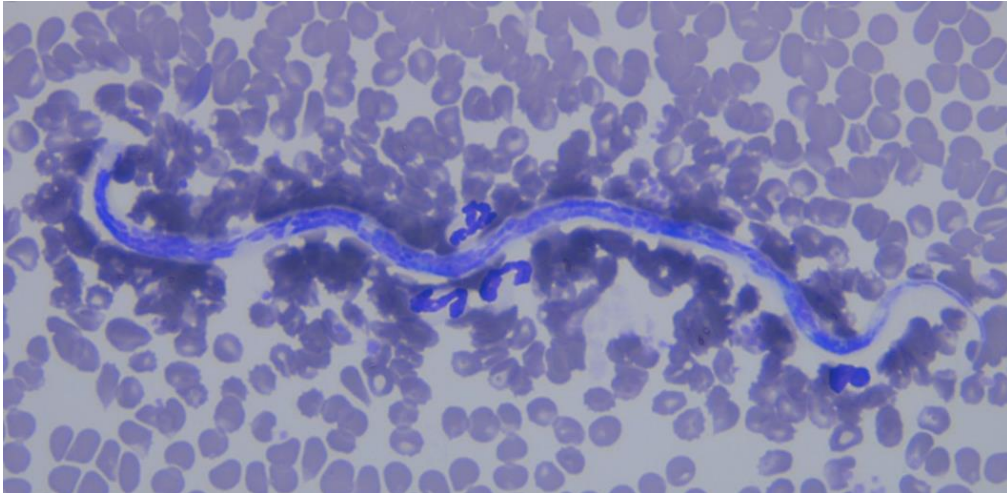
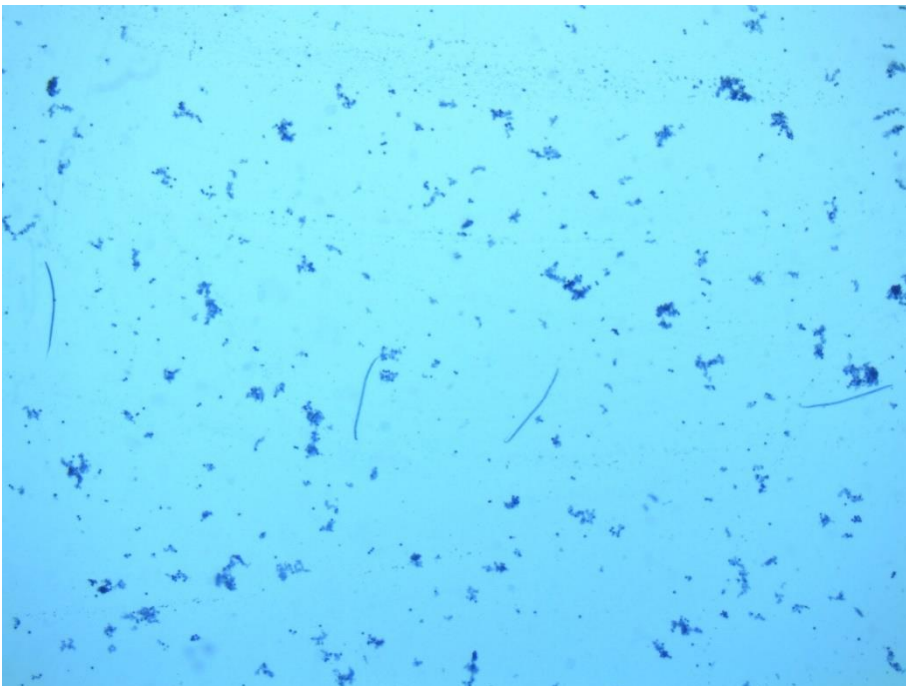


Figura 4. Frotis sanguíneo donde se observa la presencia de una microfilaria. DIFF QUICK, 10X

Estos tests se deberían realizar en casos de pacientes positivos a pruebas de antígenos o cuando se sospecha la infección en el animal. El test de Knott se puede realizar sin el frotis, pero no al contrario, pues el test de Knott concentra las microfilarias para el posterior análisis microscópico (**Figura 5**). Este test se lleva a cabo con sangre no coagulada mezclada con formol



al 2%, se homogeniza y seguidamente se centrifuga. Se retira la sangre sobrante, dejando en el fondo una especie de punto oscuro.

Finalmente, se vierte una gota de esta mezcla para observarla

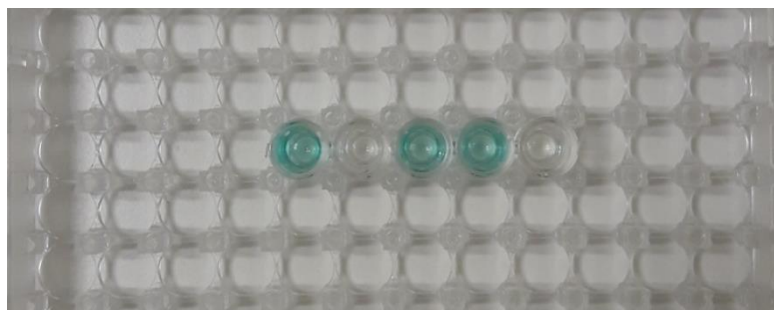
al microscopio óptico.

Figura 5. Test de Knott positivo. Se observan varias microfilarias en la preparación. 10x

Teniendo en cuenta que la mayoría de las infecciones en gatos cursan con amicrofilaremia, el test de Knott, así como el método del frotis sanguíneo, puede no resultar eficaz.

Como pruebas diagnósticas complementarias, son útiles técnicas de diagnóstico por imagen como la ecocardiografía y la radiología torácica. En el caso de la ecocardiografía, las filarias se detectan por lo común en la rama principal y derecha de la arteria pulmonar. Las filarias adultas son relativamente largas en comparación con las arterias pulmonares de los gatos, por tanto, hay mayor posibilidad de detección que en perros porque se extienden desde las ramas periféricas hacia segmentos proximales donde se observan. Es un método eficaz de diagnóstico en infecciones con varios gusanos adultos. La radiografía puede ser un método interesante para monitorizar y conocer el nivel de evolución de la enfermedad; así podemos saber si se encuentra en una fase progresiva o regresiva (American Heartworm Society, 2020).

En los últimos años, tras el estudio y conocimiento de la enfermedad en gatos, se ha llegado a la conclusión de que los métodos diagnósticos desarrollados para perros carecen de eficacia cuando se aplican en el gato. El uso de pruebas serológicas de detección de antígenos (**Figura 6**) en gatos es ineficaz pues, como se ha indicado anteriormente, las infecciones en gatos por lo común presentan amicrofilaremia y ausencia de filarias adultas o presencia escasa. Por



tanto, el objetivo se centra en la detección de la respuesta inmunitaria de los gatos hacia el parásito como método diagnóstico fiable.

Figura 6. Prueba de antígenos en muestra de perro. Algunos pocillos son positivos (presencia de color), mientras que otros son negativos (ausencia de color).

Los tests de anticuerpos tienen una ventaja sobre los de antígenos que es que son capaces de detectar la respuesta inmune hacia filarias macho, hembras e incluso larvas. Los anticuerpos aparecen aproximadamente dos meses post-infección. Sin embargo, no informan de la persistencia de la infección, solo indican si el animal ha estado infectado. El primer estudio sobre sensibilidad y especificidad de un test de anticuerpos en gatos infectados experimentalmente con gusanos adultos indica un valor de 98%. Según evidencias encontradas en varios estudios los niveles de anticuerpos en gatos descienden con el tiempo a medida que

el parásito madura. Además, los gatos con signos clínicos tienen más probabilidad de ser positivos al test de anticuerpos que los infectados asintomáticos. En este sentido, cuando las filarias son capaces de provocar signos clínicos en el gato, tanto el test de antígenos como el de anticuerpos son útiles, si se combinan aumenta considerablemente la probabilidad de llegar a un diagnóstico certero (American Heartworm Society, 2020).

Hasta el momento, solo existe un test de detección de anticuerpos anti-*D. immitis* comercializado para gatos: HESKA Solostep®FH. Se trata de un test rápido de detección de IgG frente a un antígeno específico de *D. immitis*. El antígeno, procede de un gen del parásito aislado y clonado presente en filarias macho y hembra. El test detecta anticuerpos aproximadamente 50-60 días después de la infección. Es de uso sencillo, se puede emplear tanto suero como plasma como muestra y se procede a la lectura de resultados tras cinco minutos. En este caso, se detectan las infecciones sin filarias adultas, infecciones por solo machos, por solo hembras e infecciones con machos y hembras.(Heska) (Figura 7).



Figura 7. Test de anticuerpos Heska

En la detección de anticuerpos es importante tener en cuenta que un gato positivo puede resultar consecuencia de una infección activa con desarrollo activo del parásito, pero también una infección previa que haya desencadenado la formación de anticuerpos por lo que el

parásito no se encuentra en el animal, o un estado latente previo al desarrollo del parásito que haya activado el sistema inmune. (Morchón et al., 2004)

Finalmente, es interesante conocer los detalles a observar en el caso de que se lleve a cabo una necropsia de un gato fallecido por dirofilariosis. Hay que tener en cuenta que una posibilidad en las infecciones por este parásito es la muerte súbita, por tanto, en estos casos habrá que tener siempre en consideración esta posibilidad. Es esencial fijarse en la vena cava, el corazón derecho y en las arterias pulmonares, pues es probable encontrar uno o dos gusanos, especialmente filarias inmaduras, fragmentadas o muertas. También es importante prestar atención a las partes más distales de las arterias pulmonares, pues los gusanos pueden haber sido comprimidos por el flujo sanguíneo hacia esa zona. Ocasionalmente, los gusanos se encuentran en zonas ectópicas como cavidades corporales, arterias sistémicas y, en el caso de haber observado signos neurológicos, habrá que examinar el cerebro y la médula espinal. (American Heartworm Society, 2020)

En los últimos años, debido al incremento de la preocupación por esta enfermedad en gatos, ha aumentado considerablemente el diagnóstico de la dirofilariosis, mejorando los métodos diagnósticos y, como consecuencia, incrementando el número de casos detectados.

- **TRATAMIENTO:**

Para seguir profundizando en la enfermedad, es interesante conocer las principales posibilidades de tratamiento de las que disponemos.

Debido a las características de la enfermedad en los gatos, puede ser una buena opción dejar pasar el tiempo porque existe la posibilidad de que la enfermedad se solucione de forma espontánea sin necesidad de tratamiento. Se puede monitorizar la evolución cada 6 o 12 meses llevando a cabo tests de anticuerpos y de antígenos y radiologías torácicas. Los signos de buen pronóstico son sobretudo la regresión de los patrones radiológicos (en el caso de que hayan aparecido) y la seroconversión de un positivo en test de antígenos a negativo. (C. Genchi et al., 2008)

El uso de prednisona en dosis decrecientes suele ser efectiva en casos en los que el gato muestre signos de enfermedad pulmonar. Su uso está también indicado en gatos positivos al

test de antígenos, al test de anticuerpos o a ambos que muestran signos clínicos. El ritmo de bajada de la dosis del corticoide y la posible retirada dependerá de la valoración de la clínica y signos radiológicos.

En casos en los que el paciente se encuentre desestabilizado habrá que actuar inmediatamente y de forma apropiada para tratar el shock. Se recomienda el uso de corticosteroides vía intravenosa, fluidoterapia balanceada, broncodilatadores y oxigenación.

El tratamiento mediante adulticidas no se recomienda por la escasez de experiencia y de datos. El resultado de un estudio preliminar muestra que la dosis tóxica de la melarsomina es muy baja en gatos. Sin embargo, se ha demostrado que el uso de ivermectina reduce la carga parasitaria considerablemente en comparación con gatos sin tratamiento, aunque, debido a las bajas cargas que presentan habitualmente, no son la primera causa de las complicaciones de la enfermedad, sino la reacción anafiláctica a la muerte de los gusanos. Por tanto, hasta la fecha, no existen estudios que relacionen el uso de terapias adulticidas con un aumento de la supervivencia en gatos infectados con filarias adultas. (American Heartworm Society, 2020).

Finalmente, se recomienda el uso de tratamiento químico profiláctico de administración mensual. Se ha demostrado que en zonas donde la enfermedad se considera endémica en perros y existe posibilidad de transmisión por vectores, la profilaxis es efectiva en gatos (American Heartworm Society, 2020).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Hasta hace unos años, el diagnóstico de dirofilariosis en gatos carecía de herramientas útiles y eficaces. Gracias a la investigación y al estudio de esta enfermedad en gatos se ha demostrado que los métodos diagnósticos usados en perros basados en la detección de los antígenos de *D. immitis* en sangre circulante son poco sensibles cuando se aplican al gato, dado que la carga parasitaria (número de gusanos adultos presentes) es mínimo, de forma que los niveles de antígenos circulantes se encuentran por debajo del umbral de detección de estos tests de antígenos. En este sentido, las casas comerciales están empezando a desarrollar nuevos tests de detección de anticuerpos anti-*D. immitis* orientados a gatos.

En el estudio realizado por Villanueva et al.(2021) en gatos, se obtuvo una prevalencia relativamente baja con el test SoloStep®FH si la comparamos con la obtenida mediante la técnica ELISA. Dicho test es la primera prueba de anticuerpos comercializado para la detección de *D. immitis* en gatos.

El presente trabajo es una evaluación de la eficacia de un nuevo test de detección de anticuerpos de aplicación en la especie felina. El desarrollo de métodos con elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica para detectar anticuerpos anti-*Dirofilaria* en gatos es de gran interés porque nos permite conocer el nivel de seroprevalencia y por tanto es el primer paso para el control de una enfermedad transmisible.

El principal objetivo de este TFG es evaluar si la prueba en desarrollo es capaz de detectar anticuerpos anti-*Dirofilaria* en muestras de suero caracterizadas. Como objetivo secundario sería comparar los resultados obtenidos con el uso del nuevo test frente a la técnica de referencia, en este caso HESKA, para valorar su rendimiento diagnóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suero:

Se han utilizado un total de 250 muestras de sueros de gatos procedentes del Laboratorio de Inmunopatología Clínica de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Estas muestras han sido previamente testadas mediante diferentes pruebas incluyendo la prueba de Knott modificada, tres pruebas de detección de antígenos (dos ELISAS y una prueba de inmunocromatografía rápida) y dos pruebas de detección de anticuerpos (ELISA y SoloStep®FH). Los sueros son muestras residuales procedentes de 110 machos y 140 hembras sanos de más de un año de edad.

Test rápido de laboratorio en desarrollo:

Para este estudio se ha empleado un test de inmunocromatografía que emplea como antígeno proteína recombinante de *D. immitis*. Las características del tipo de antígeno no se pueden concretar ya que se encuentra bajo secreto industrial. La prueba rápida ha sido cedida por la empresa UranoVet (Barcelona).

Test rápido de referencia HESKA®:

El test rápido de HESKA® se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La realización de la prueba fue realizada por el mismo operador sin tener conocimiento de los resultados obtenidos a las otras pruebas serológicas de detección de anticuerpos anti-*Dirofilaria*.

Test ELISA de detección de anticuerpos anti-*Dirofilaria*:

La técnica ELISA se basó en lo descrito en el material y métodos publicado por Villanueva-Saz et al. (2021) y que consiste en la utilización de antígeno recombinante de *D. immitis*.

Análisis estadístico:

Se realizó un análisis descriptivo de los resultados. Por otro lado, para evaluar el grado de acuerdo entre pruebas, se calculó el índice Kappa. La máxima concordancia posible corresponde a $k = 1$. El valor $k = 0$ se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. Si la concordancia es mayor que la esperada simplemente a causa del azar, $k > 0$, mientras si es menor, $k < 0$. El mínimo valor de k depende de las distribuciones marginales. Teniendo en cuenta el valor de k , es

posible establecer una fuerza de concordancia entre pruebas: $< 0,20$ es equivalente a una fuerza de concordancia pobre, $\geq 0,21$ - $<0,40$ equivale a una fuerza de concordancia débil, $\geq 0,41$ - $\leq 0,60$ equivale a una fuerza de concordancia moderada, $\geq 0,61$ - $\leq 0,80$ es equivalente a una fuerza de concordancia buena y finalmente un valor $\geq 0,81$ - $\leq 1,00$ equivale una fuerza de concordancia muy buena.

RESULTADOS

De las 250 muestras de suero analizadas, el test SoloStep®FH detectó anticuerpos en nueve animales, mientras que la prueba ELISA detectó en 61 sueros (ocho muestras con niveles altos, 35 muestras con niveles de anticuerpos medios y finalmente 18 muestras con niveles bajos de anticuerpos). En relación al test rápido en desarrollo evaluado, detectó un total de 40 muestras (40/61). Todas las muestras seropositivas en el test rápido en desarrollo fueron también positivas para la prueba de ELISA, detectando todas las muestras con niveles altos (8) y la mayoría de las muestras con niveles medios de anticuerpos (32). Dos muestras seropositivas para el test rápido SoloStep®FH, fueron negativas para el test ELISA y el test rápido en evaluación. Considerando el sexo, 12 muestras fueron machos y las restantes 28 fueron hembras.

En relación al índice Kappa, el grado de acuerdo entre la prueba ELISA y el test rápido de UranoVet fue de 0,74, clasificándose como buena. En el caso del grado de concordancia entre el ELISA y la prueba SoloStep®FH, éste fue del 0,24 clasificándose la concordancia como débil.

DISCUSIÓN

Para contextualizar los datos obtenidos en este estudio, primero es necesario conocer las distintas prevalencias que se han obtenido en estudios realizados en otras ciudades de España. Hasta el momento, solo se dispone de datos obtenidos en estudios realizados en Madrid, Barcelona, Islas Canarias y Zaragoza. El objetivo de esta comparación es constatar si las diferencias entre las distintas prevalencias se pueden considerar significativas o no, y en caso afirmativo, hallar las causas.

En este sentido, se van a comparar los datos obtenidos en los cuatro estudios analizando factores que pueden contribuir a la variedad de resultados.

- **INFLUENCIA DE FACTORES EN DATOS DE PREVALENCIA**

Prevalencias

España es un país endémico cuando hablamos de *Dirofilariosis* en gatos, pero hasta el momento la información acerca de la prevalencia es limitada.

En el estudio llevado a cabo en Madrid (José Alberto Montoya-Alonso et al., 2017) se analizaron 531 muestras de suero de gato mediante un test de detección de antígenos y también de detección de anticuerpos anti-*D.immitis* y anti-*Wolbachia*. El resultado muestra un 0,2% de positivos al test de antígenos y un 7,3% de seroprevalencia observada mediante el test de detección de anticuerpos, considerándose positivos los sueros que contengan anticuerpos frente a *D.immitis* y frente a *Wolbachia*.

En otro estudio, en Barcelona (José Alberto Montoya-Alonso et al., 2014), se analizaron 758 muestras de gatos mediante tests de detección de antígenos, así como test de anticuerpos anti-*Wolbachia* y anti-*D.immitis* para hallar la prevalencia. Los resultados obtenidos reflejan un 0,26% de gatos positivos a antígenos y un 11,47% de los gatos presentaron anticuerpos frente a ambos agentes.

En el estudio de prevalencia realizado en Zaragoza (Villanueva et al., 2021), se llevó a cabo un análisis de 250 muestras. Se analizaron mediante un test de antígenos, el test de Knott y un frotis sanguíneo, de los que ningún animal resultó positivo. En cuanto al análisis de detección de anticuerpos, la seroprevalencia observada fue del 25,2% (63/250) detectado un 3,6% mediante SoloStep®FH y un 24,4% mediante el método ELISA. Mediante el uso del nuevo test rápido de UranoVet en el presente estudio, la prevalencia observada tras el análisis de las mismas muestras es del 16%.

Finalmente, en las Islas Canarias (J. A. Montoya-Alonso et al., 2016), el análisis de prevalencia se llevó a cabo a partir de 707 muestras. Los sueros de gato fueron analizados mediante detección de anticuerpos anti-*D.immitis* y anti-*Wolbachia*, considerando seropositivos a los gatos que presenten ambos anticuerpos. La prevalencia obtenida en este estudio fue del 18,1%.

Condiciones de vida

Un aspecto clave para interpretar las diferencias observadas en cuanto a prevalencia en las distintas ciudades donde se han realizado los estudios es el estilo de vida de los gatos empleados.

Para el estudio llevado a cabo en Madrid, las muestras se obtuvieron de gatos con distintas condiciones de vida, desde gatos de vida interior hasta gatos de vida libre, pasando por gatos de vida mixta. En este caso, la menor prevalencia observada correspondió a los gatos de vida interior (4,6%), seguida de los gatos exterior (10,4%) y en los de vida mixta fue donde mayor prevalencia se observó (11,4%).

En Barcelona, para el estudio se tomaron muestras de gatos de nuevo de los tres diferentes estilos de vida. Los resultados muestran diferencias según las condiciones de vida. La prevalencia en gatos de vida interior fue de 7,05%, mientras que en gatos exterior fue de 21,2%. Los gatos de vida mixta mostraron un 9,9% de seroprevalencia.

En el estudio realizado en Zaragoza los animales analizados fueron gatos de vida libre. La prevalencia observada fue del 25,2%. Son muchas las causas que pueden explicar esta alta prevalencia en relación con Madrid y Barcelona, sin embargo, es evidente que el estilo de vida de los animales es un factor determinante que se refleja en las prevalencias.

Finalmente, en el estudio realizado en las Islas Canarias, se emplearon muestras tomadas en clínicas a partir de gatos de propietario. En el estudio no se especifica las condiciones de vida de estos pacientes.

Sexo

Las muestras tomadas en el estudio de prevalencia en Madrid fueron 51,4% de hembras y 48,4% de machos. La prevalencia en hembras fue de un 7,7% mientras que en machos un 7,0%.

En el caso de Barcelona, la mayoría de gatos del estudio fueron machos (56,5%) y el resto (43,5%) hembras. Los resultados reflejan que, de los positivos, un 62,1% fueron machos y un 37,9% hembras.

En el estudio en Zaragoza, las muestras son un 56% de hembras y un 44% de machos. En los resultados del test ELISA se observa una prevalencia de 22,72% en machos y un 25,71% en hembras.

En Canarias, se toman muestras de 368 hembras y 339 machos. Las prevalencias resultantes son de 18,3% en machos y 17,9% en hembras.

Raza

En el estudio en Madrid, la raza con mayor prevalencia fue la Europea de pelo corto (7,5%) por encima de la media de otras razas (7,1%). Sin embargo, en Barcelona, la raza con mayor seroprevalencia observada fue la Siamesa (19,6%), seguida de mestizos (18,2%). En las Islas Canarias, la mayor prevalencia detectada se asocia a gatos mestizos (20,2%), superior a gatos de razas puras (7,4%).

Edad

En Madrid, la mayor prevalencia observada fue en el rango de edad de entre 6 y 9 años (11,4%). En Barcelona, entre 3 y 6 años (13,7%) y en Canarias en menores de 3 años (20,1%).

Habiendo expuesto las distintas prevalencias obtenidas en los estudios previos, se puede intuir que existen varios factores determinantes que hacen variar los datos. Los principales son el área geográfica y las condiciones de vida del gato.

Las ciudades de la España peninsular donde se han llevado a cabo los estudios presentan climas templados y presencia de ríos. Estos son dos factores que potencian la supervivencia de los vectores de este parásito. Además, dentro de una misma ciudad, las mayores prevalencias observadas a menudo coinciden con zonas bajo la influencia de ríos. El caso de Canarias debe ser analizado de forma independiente a la Península, pues la climatología de las Islas es completamente diferente. Al situarse más cerca del ecuador, la estacionalidad no es tan marcada como en las ciudades citadas. Este podría ser un hecho que favorezca la supervivencia de los vectores, así como la prolongación de su actividad a las estaciones de otoño-invierno. Montoya-Alonso et al. (2016) asocian la disparidad de prevalencias entre las

diferentes islas a las condiciones climáticas de cada una. En este sentido, las islas con predominancia de clima desértico presentan niveles bajos o carencia de *D. immitis*, en cambio, las islas con climas más húmedos y con mayor frecuencia de precipitaciones presentan unas prevalencias muy elevadas. Este dato coincide con las conclusiones obtenidas en las ciudades de la Península. La humedad favorece el desarrollo y supervivencia del vector, obteniendo mayores prevalencias en dichas zonas. Se puede afirmar que la climatología es un factor determinante para la distribución del vector y, por tanto, del parásito.

Además, cabe destacar que, a raíz del calentamiento global, en la Península cada vez va a ser más complicado diferenciar las cuatro estaciones, alargándose el verano a parte de la primavera y el otoño. Este hecho puede sugerir una mayor duración de la temporada de actividad de los vectores, un clima más idóneo para su desarrollo.

En cuanto al estilo de vida de los gatos, los resultados apuntan una mayor seroprevalencia en gatos de vida libre en comparación con gatos de vida exterior. Este hecho se puede explicar por varias razones. Los animales de vida exterior son gatos que pasan la totalidad de su vida en casa y, probablemente, son gatos de propietario. En este sentido, es más probable que dispongan de algún plan de profilaxis frente al parásito (antiparasitarios) o frente al vector. Además, es poco probable que el vector pueda llegar a inocular el parásito a un gato indoor. El escaso o nulo contacto con los mosquitos hace que se reduzca considerablemente la prevalencia en este tipo de gatos. Por otro lado, los gatos de vida libre presentan una situación contraria en este sentido. Se trata de gatos con menor probabilidad de tener propietario y con mayor exposición al vector. Por tanto, serán gatos seguramente sin tratamiento profiláctico. Dentro de este grupo cabe diferenciar entre gatos pertenecientes a colonias urbanas y gatos de que puedan vivir en casas en pueblos, campo, etc. Los gatos que conviven en colonias tendrán más posibilidades de infectarse si hay presencia de vectores en ellas. En la ciudad de Zaragoza, existe un gran número de colonias felinas situadas en la orilla de los ríos Ebro, Huerva y Gállego, en estos casos se suman todos los factores (densidad de población, supervivencia del vector, ausencia de profilaxis) para obtener altas prevalencias.

Finalmente, factores como la edad o raza de los gatos, no parecen determinantes para que se produzca la infección.

- **MÉTODO DIAGNÓSTICO**

Teniendo en cuenta un estudio realizado en Italia (Genchi et al., 2019) respecto al diagnóstico de dirofilariosis en gatos; la técnica más usada es la serología de detección de antígenos,

empleada como único método por el 26,9% de los encuestados, en combinación con frotis sanguíneos (22,7%), ecografía (16,2%), test de Knott (9,2%) y radiografía torácica (8%). Un 27,4% de los veterinarios encuestados confían el diagnóstico completo a un laboratorio externo.

Los estudios de prevalencia realizados en España han basado la detección en pruebas de antígenos y técnicas serológicas descritas por Morchón et al. (2004). Como se ha indicado en el presente trabajo, las técnicas de detección de antígenos resultan muy poco representativas en gatos. Los datos obtenidos en los diferentes estudios de prevalencia no concuerdan con las prevalencias reales obtenidas mediante técnicas de detección de anticuerpos. Esta discordancia se debe a las características distintas y específicas de los gatos frente a la infección. Según Morchón et al. (2004) el sistema inmunitario del gato, en concreto las IgG, puede ser el responsable de que la infección por *D.immitis* curse habitualmente sin microfilaremia y sin presencia de gran número de filarias adultas. Es esencial conocer estas características a la hora del diagnóstico. En una infección en gatos, es poco frecuente encontrar antígenos en suero debido a la escasez o carencia de filarias adultas. Este hecho, también es significativo en relación al diagnóstico por imagen, pues es poco frecuente detectar filarias adultas mediante ecocardiografía, a pesar de ser útil en perros. Además, la amicrofilaremia dificulta enormemente el diagnóstico mediante pruebas de laboratorio como el test de Knott o el frotis sanguíneo.

Teniendo en cuenta el curso característico de las Dirofilariosis en gatos, hasta el momento, el método más fiable es la detección de anticuerpos. El único test rápido comercializado de detección de anticuerpos frente a *D.immitis* es SoloStep®FH. En el estudio de prevalencia en gatos de vida libre en Zaragoza (Villanueva-Saz et al., 2021), se empleó este test con un resultado de prevalencia de 3,6% (9/250), frente al 24,4% (61/250) obtenido mediante ELISA. Aunque los autores asocian esta gran diferencia a posibles falsos positivos debido a la reactividad cruzada del test más sensible. En este trabajo, a partir de las mismas muestras, los resultados obtenidos mediante el nuevo test rápido de detección de anticuerpos son del 16% (40/250). Esta prevalencia obtenida se acerca más a la detectada mediante ELISA y es considerablemente superior a la obtenida con el uso del test SoloStep®FH. Según los datos obtenidos en nuestro estudio, el nuevo test detecta un mayor número de animales seropositivos en comparación al test rápido de Heska®.

CONCLUSIONES

Castellano:

-De la revisión bibliográfica podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Factores como las condiciones de vida y la zona geográfica determinan las distintas prevalencias.
- Factores como la raza, edad o sexo de los hospedadores no repercuten sobre los valores de prevalencia.
- El calentamiento global propicia que más países se unan a la lista de países endémicos por la adaptación de los vectores.
- Los métodos de diagnóstico desarrollados para perros son poco fiables cuando se aplican a los gatos.

-De los resultados obtenidos del trabajo experimentan en el laboratorio podemos extraer las siguientes conclusiones:

- El test de anticuerpos desarrollado por UranoVet es capaz de detectar la presencia de anticuerpos anti-Dirofilaria en sueros de gatos caracterizados.
- El test de anticuerpos de UranoVet es capaz de detectar un mayor número de animales seropositivos en comparación con el único test comercialmente disponible SoloStep®FH.
- El grado de acuerdo entre el ELISA de referencia y el test rápido de UranoVet para detectar anticuerpos anti-*Dirofilaria* es mayor en comparación al grado de acuerdo entre el ELISA y el test SoloStep®FH.

English:

-From the literature review we can draw the following conclusions:

- Factors such as living conditions and geographical area determine the different prevalence results.
- Factors such as breed, age or sex of hosts do not affect prevalence values.
- Global warming forces more countries to join the list of endemic countries due to vector adaptation.
- Diagnostic methods developed for dogs are unreliable when applied to cats.

-From the results obtained from the work experimented in the laboratory we can draw the following conclusions:

- The antibody test developed by UranoVet is able to detect the presence of anti-Dirofilaria antibodies in characterized cat sera.
- The UranoVet antibody test is able to detect a higher number of seropositive animals compared to the only commercially available SoloStep®FH test.
- The degree of agreement between the reference ELISA and the rapid UranoVet test for detecting anti-Dirofilaria antibodies is higher compared to the degree of agreement between the ELISA and the SoloStep®FH test.

VALORACIÓN PERSONAL

Mediante la realización de este trabajo he adquirido seguridad y comodidad a la hora de buscar información en fuentes científicas. Además de todo lo que he aprendido respecto al tema de mi trabajo.

He descubierto el funcionamiento de nuevas técnicas de diagnóstico que desconocía como el test de Knott o las técnicas de diagnóstico por imagen aplicadas a esta enfermedad. Así como la distribución y los factores que afectan a una enfermedad transmitida por vectores.

Por otra parte, al ser un trabajo llevado a cabo durante casi todo el curso, he podido dosificar el tiempo que he dedicado de modo que me ha permitido complementarlo con horas de estudio o de ocio. En este sentido, valoro positivamente haberme adaptado a un ritmo de trabajo diferente al que estamos acostumbrados.

BIBLIOGRAFÍA

- Anvari, D., Narouei, E., Daryani, A., Sarvi, S., Moosazadeh, M., Ziaei Hezarjaribi, H., Narouei, M. R., & Gholami, S. (2020). The global status of *Dirofilaria immitis* in dogs: a systematic review and meta-analysis based on published articles. *Research in Veterinary Science*, 131(March 2019), 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.002>
- Bendas, A. J. R., Branco, A. S., da Silva, B. R. S. A., Paiva, J. P., de Miranda, M. G. N., Mendes-de-Almeida, F., & Labarthe, N. V. (2019). Mosquito abundance in a *Dirofilaria immitis* hotspot in the eastern state of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 18(July), 100320. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100320>
- Carretón, E., Morchón, R., & Montoya, A. J. A. (2017). *Dirofilariosis cardiopulmonar canina*. *Dirofilariosis Cardiopulmonar Canina*, 1–10. <https://www.berri.es/pdf/DIROFILARIOSIS,Pautas de manejo clínico/9788496344440>
- Diakou, A., Soubasis, N., Chochlios, T., Oikonomidis, I. L., Tselekis, D., Koutinas, C., Karaiosis, R., Psaralexi, E., Tsouloufi, T. K., Brellou, G., Kritsepi-Konstantinou, M., & Rallis, T. (2019). Canine and feline dirofilariosis in a highly enzootic area: first report of feline dirofilariosis in Greece. *Parasitology Research*, 118(2), 677–682. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6135-9>
- Drugs.com. (2021). *HESKA Solo Step FH Feline Heartworm Test Cassettes*. Recuperado el 17 junio 2021, de <https://www.drugs.com/vet/heska-solo-step-fh-feline-heartworm-test-cassettes.html#>
- Genchi, C., Venco, L., Ferrari, N., Mortarino, M., & Genchi, M. (2008). Feline heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection: A statistical elaboration of the duration of the infection and life expectancy in asymptomatic cats. *Veterinary Parasitology*, 158(3), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.005>
- Genchi, M., Rinaldi, L., Venco, L., Cringoli, G., Vismarra, A., & Kramer, L. (2019). *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: A questionnaire study in Italy. *Veterinary Parasitology*, 267(November 2018), 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.01.014>
- Litster, A. L., & Atwell, R. B. (2008). Feline heartworm disease: a clinical review. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(2), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.09.007>
- Montoya-Alonso, J. A., Carretón, E., Morchón, R., Silveira-Viera, L., Falcón, Y., & Simón, F.

- (2016). The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands. *Veterinary Parasitology*, 216, 66–71.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.005>
- Montoya-Alonso, José Alberto, Carretón, E., García-Guasch, L., Expósito, J., Armario, B., Morchón, R., & Simón, F. (2014). First epidemiological report of feline heartworm infection in the Barcelona metropolitan area (Spain). *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1186/s13071-014-0506-6>
- Montoya-Alonso, José Alberto, Morchón, R., Falcón-Cordón, Y., Falcón-Cordón, S., Simón, F., & Carretón, E. (2017). Prevalence of heartworm in dogs and cats of Madrid, Spain. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2299-x>
- Morchón, R., Ferreira, A. C., Martín-Pacho, J. R., Montoya, A., Mortarino, M., Genchi, C., & Simón, F. (2004). Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Veterinary Parasitology*, 125(3–4), 313–321.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.08.003>
- Morchón, Rodrigo, Carretón, E., González-Miguel, J., & Mellado-Hernández, I. (2012). Heartworm disease (*dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe - new distribution trends. *Frontiers in Physiology*, 3 JUN(June), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00196>
- Piermarini, P. M., Esquivel, C. J., & Denton, J. S. (2017). Malpighian tubules as novel targets for mosquito control. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/ijerph14020111>
- UranoVet. (2020). *Uranotest Dirofilaria*. Recuperado el 17 junio 2021, de <https://www.uranovet.com/es/producto/uranotest-dirofilaria>
- Vieira, L., Silvestre-Ferreira, A. C., Fontes-Sousa, A. P., Balreira, A. C., Morchón, R., Carretón, E., Vilhena, H., Simón, F., & Montoya-Alonso, J. A. (2015). Seroprevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in feline and canine hosts from central and northern Portugal. *Journal of Helminthology*, 89(5), 625–629. <https://doi.org/10.1017/S0022149X14000352>
- Villanueva-saz, S., Giner, J., Verde, M., Yzuel, A., González, A., Lacasta, D., Marteles, D., & Fernández, A. (2021). Prevalence of microfilariae, antigen and antibodies of feline dirofilariosis infection (*Dirofilaria immitis*) in the Zaragoza metropolitan area, Spain.

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 23(December 2020).

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100541>

Virbac BVT. *Speed Diro*. Recuperado el 17 junio 2021, de

<https://bvt.virbac.com/en/home/diagnostic-solutions/pour-le-veterinaire-praticien/vector-borne-and-parasitic-disea/main/produits/speed-diro.html>